УДК 636.2.034

# ДНК-ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ И МАРКЕРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К МАСТИТАМ

**Т.И. Епишко[1], О.А. Епишко[1], М.В. Скуловец[2], О.А. Яцына[2]**

[1] – УО «Полесский государственный университет», г. Пинск;
[2] – УО «Пинский государственный аграрный технологический колледж», г. Пинск;
[3] – УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

*(Поступила в редакцию 31.05.2010 г.)*

***Аннотация.*** *Предложены тест-системы для ДНК-идентификации возбудителей маститов - Staph. aureus и Strep. Agalactiae, целесообразность применения которых подтверждена экспериментально, позволяющие сократить затраты времени на постановку диагноза с 48 до 3,5 часов.*

*Выявлена закономерность позитивного влияния гетерозиготного генотипа $CSN3^{AB}$ и аллеля $CSN3^{B}$ гена каппа-казеина на устойчивость к заболеваемости коров белорусской черно-пестрой породы маститами. Для создания резистентной к маститу популяции коров в СПК «Ольговское» Витебской обл. рекомендовано увеличить концентрацию в стаде особей с генотипами $CSN3^{AB}$ и $CSN3^{BB}$, что станет залогом не только повышения белковомолочности животных, но и резистентности к данному заболеванию.*

***Summary.*** *Test-systems for DNA-identification of activators of a mastitis – Staph are offered. aureus and Strep. Agalactiae which expediency of application is confirmed experimentally, allowing to reduce expenses of time for statement of the diagnosis from 48 o'clock till 3,5 o'clock.*

*Law of positive influence of heterozygotic genotype CSN3AB and allele CSN3B a kappa-casein gene on stability to disease of cows of the Belarus black-motley breed of a mastitis is revealed. For creation resistant to a mastitis of population of cows in APK "Olgovsky" it is recommended to Vitebsk region to increase concentration in herd of individuals with genotypes CSN3AB and CSN3BB that becomes pledge not only increases белковомолочности animals, but also their resistance to the given disease.*

**Введение.** Одной из важнейших задач молочного скотоводства является не только увеличение объемов производства молока, но и, самое главное, – сохранение его биологической ценности и санитарного качества, от которого зависит здоровье человека, а также экономический потенциал хозяйств и предприятий перерабатывающей промышленности. Одной из основных причин, вызывающих снижение качества молочной продукции, являются маститы – заболевание молочной железы, вызванное биологическими (стрептококки, стафилококки и др.), механическими, термическими и химическими факторами [1].

В среднем на молочно-товарных фермах Республики Беларусь маститы обнаруживаются у 20-40% коров. Даже в лучших госплемзаводах

количество животных с превышением нормы содержания соматических клеток в молоке, имеющих высокую корреляционную связь с заболеваемостью животных маститом, составляет 25-30% стада. Учитывая то, что одна переболевшая маститом корова снижает молочную продуктивность на 10-15% от годового надоя, а у половины переболевших животных молочная продуктивность не восстанавливается и в последующие лактации, ежегодные потери молока в республике по этой причине составляют около 390 тыс. тонн на сумму более 55-57 млн. долларов США [2, 3].

В хозяйствах Брестской и Витебской областей заболеваемость коров клинически выраженными маститами составляет от 16,5 до 20,8%, а субклиническими – 32-34,5%, которые невозможно диагностировать визуально [2, 3].

Более чем 80% случаев в этиологии и патогенезе мастита играет микрофлора. Если же мастит возникает по иным причинам, то все равно дальнейшее течение болезни осложняется микробным фактором, который в этом случае будет вторичным. Чаще причиной возникновения мастита становятся бактерии группы кишечной палочки, стафилококки, стрептококки. В последние годы наблюдается увеличение роли антибиотикоустойчивых микробов в этиологии маститов, что является результатом отсутствия эффективной диагностики возбудителя и предварительного проведения определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам с целью выбора наиболее эффективного препарата [1, 3, 5, 6, 7, 8, 9].

Следовательно, поиск эффективных, экологически чистых средств для лечения и профилактики мастита является одной из актуальных задач ветеринарии. Для лечения маститов применяют множество методов и лекарственных средств. К традиционным методам лечения следует отнести применение антимикробных препаратов (антибиотики, сульфаниламиды и др.), анестетиков (новокаин, тримекаин и др.), гормональных (окситацин). Основным недостатком применения этих препаратов является загрязнение молока остаточным количеством лекарственных препаратов. Кроме того, широкое применение антибиотиков приводит к тому, что содержание их в молоке постоянно возрастает. Антибиотики, попадая с молоком в организм человека, приводят к появлению у него устойчивых рас микробов, снижая эффективность применения антибактериальных препаратов в медицинской практике.

Систематическое использование антибиотиков для лечения мастита у коров привело к значительному снижению эффективности такой терапии. Воспаление молочной железы должно рассматриваться не как местный локальный воспалительный процесс, а как заболевание, в ко-

торое вовлекаются многие системы организма [2].

Исследования, проводимые во многих странах мира, свидетельствуют, что среди множества причин, способствующих возникновению заболевания молочной железы коров, наиболее значимой является генетическая предрасположенность животных, а степень маститоустойчивости в определенной степени зависит от наследственных качеств отцов (быков-производителей). В связи с этим интерес представляют исследования, направленные на выявление не только тест-систем диагностирующих возбудителей, но и ДНК-маркеров устойчивости животных к данному заболеванию, дающих возможность проводить селекционные программы на создание резистентных к маститам стад. Предполагается, что таким маркером может служить ген каппа-казеина.

Создание в Республике Беларусь стад коров, в наименьшей степени восприимчивых к заболеванию маститом, является одной из важнейших задач молочного скотоводства. Недооценка этой проблемы приводит к значительным потерям молока и, как следствие, общему снижению эффективности ведения молочного скотоводства.

В связи с чем целью наших исследований был поиск генетических маркеров для диагностики Staph. aureus и Strep. Agalactiae – вызывающих заболевание молочной железы коров, согласно нашим данным, в 25% и 35% случаев соответственно, а также выявление ДНК-маркеров детерминирующих устойчивость к данному заболеванию.

**Материал и методика исследований.** Исследования проведены в УО «Полесский государственный университет», УО «Витебская государственная ордена «Знак Почета» академия ветеринарной медицины», СПК «Ольговское» Витебской области.

Объектом исследований служили 380 образцов ДНК коров черно-пестрой породы, а также пробы молока и крови больных маститом животных.

Ядерную ДНК коров выделяли перхлоратным методом. В качестве основы использованы методики Брэма Г. и Бренинга Б.

ДНК возбудителей выделяли из молока больных маститом животных с использованием диагностических наборов.

При проведении мультиплексной ПЦР для диагностики S. aureus, S. agalactiae. использовали праймеры, нуклеотидные последовательности которых были предложены Forsman, al., 1997:

S. aureus: TCTTCAGAAGATGCCGAATA
TAAGTCAAACGTTAACATACG
S. agalactiae: AAGGAAACCTGCCATTTG
TTAACCTAGTTTCTTTAAAACTAGAA, и ПЦР -

программу: «горячий старт» – 95°С – 5мин; 36 циклов: денатурация – 95°С – 1 мин, отжиг - 59°С – 30 сек, синтез – 72°С – 30 сек; эллонгация –72°С – 7 мин.

Проведены исследования по изучению ассоциации полиморфных вариантов гена CSN3 с частотой заболеваемости коров маститами.

ДНК-тестирование животных по гену каппа-казеина проводилось методом ПЦР-ПДРФ с использованием праймеров: CAS1 и CAS2:

CAS1: 5′ -ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG T- 3′;

CAS2: 5′- TTT ATT AAT AAG TCC ATG AAT CTT G -3′, и ПЦР - программы: «горячий старт» – 95°С – 5 мин; 35 циклов: денатурация – 94°С – 1мин, отжиг - 58°С – 1 мин, синтез – 72°С – 1 мин; эллонгация – 72°С – 5 мин.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Одну из главных ролей в этиологии и патогенезе мастита играет микрофлора, которая является одним из источников заболевания.

Пробы для бактериального анализа отбирали у животных с клинической и субклинической формами мастита.

Проведенный нами бактериальный анализ проб секрета вымени коров в СПК «Ольговское» Витебской области выявил присутствие следующих микроорганизмов: в 35% случаев - Strep. Agalactiae, 25,0% - Staph. aureus, 20% - E. Coli, 15% проб находились в ассоциации - E. coli, Staph. epidermidis, Strep. Agalactiae (рисунок 1). Очевидно, что 60% случаев заболеваний приходится на маститы микробной этиологии, возбудителями которых являются Staph. Aureus и Strep. Agalactiae.

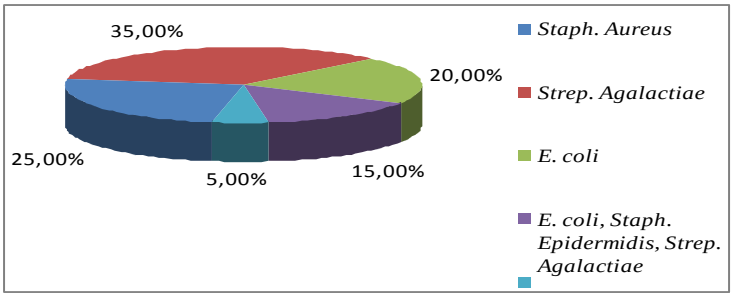



Рисунок 1 – Бактериологическое исследование проб молочного секрета у коров, больных маститом

В 5% проб возбудителей заболевания не выявлено, что указывает на то, что в возникновении мастита микробный фактор не является единственным.

Следовательно, в этиологии мастита основную роль играют микроорганизмы, которые приводят к развитию воспаления в тканях молоч-

ной железы.

В связи с этим возникает необходимость в ранней, быстрой и эффективной диагностике возбудителей воспаления молочной железы с помощью ДНК-тестов.

Идентификация видов бактерий стандартными бактериологическими методами требует более 48 часов. Кроме того, данные методы диагностики не всегда позволяют выявить патогены в молоке, полученном от коров с субклиническим маститом из-за очень небольшого количества возбудителей или же остаточного присутствия антибиотиков, которые ингибируют рост бактерий in vitro. Нами разработаны тест-системы с использованием предложенных Forsman, al., 1997 праймеров, позволяющие проводить ПЦР диагностику Staph. Aureus и Strep. Agalactiae в течение 3-3,5 часов.

Результаты идентификации возбудителей, полученные стандартными бактериологическими методами, были в 100% случаев подтверждены при проведении ПЦР-диагностики патагенов, при этом затраты времени были сокращены с 48 до 3,5 часов.

Проведенные исследования свидетельствуют о целесообразности использования данных маркеров для идентификации основных возбудителей мастита: Staph. aureus и Strep. agalactiae.

Однако разработка эффективных методов диагностики штаммов возбудителей маститов – это решение только одной из задач при создании высокопродуктивных стад скота, свободных от данного заболевания. Необходимо создавать популяции коров, генетически устойчивые к заболеванию молочной железы. Интенсификации данного процесса будет способствовать использование в селекционном процессе ДНК-маркеров, напрямую или косвенно детерминирующих невосприимчивость животных к заболеванию.

Повышение уровня естественной резистентности к маститам у коров может быть следствием целенаправленного отбора и подбора, обеспечивающих распространение и закрепление в популяции желательных генотипов путем селекции, а способность животных проявлять повышенную резистентность к болезням становится важным селекционным признаком.

При изучении ассоциаций полиморфных вариантов гена каппа-казеина с молочной продуктивностью коров нами был отмечен различный уровень устойчивости животных к маститам. Была выдвинута рабочая гипотеза: о влиянии полиморфизма гена CSN3 на устойчивость коров к данному заболеванию.

В этой связи проведен анализ заболеваемости коров белорусской черно-пестрой породы маститами в условиях СПК «Ольговское» в за-

висимости от полиморфизма гена каппа-казеина (таблица 1).

Таблица 1 – Заболеваемость коров маститами в зависимости от полиморфизма гена каппа-казеина

| Генотип | Всего обследовано коров | из них больных маститами | |
|---|---|---|---|
| | | голов | % |
| АА | 264 | 75* | 28,4 |
| АВ | 100 | 19* | 19,0 |
| ВВ | 16 | 4 | 25,0 |
| Итого | 380 | 98 | 25,7 |

Примечание: * - межгрупповые различия статистически достоверны при P>0,95

Исследованиями установлено, что резистентность животных к маститу определяется их генотипом. Среди особей, имеющих генотип $CSN3^{AA}$ и $CSN3^{BB}$, наблюдалось наибольшее количество заболевших коров маститами – 28,4 % и 25,0 % соответственно. Наименьший процент больных коров имели особи с гетерозиготным генотипом ($CSN3^{AB}$) – 19,0%, что на 9,4% и на 6% ниже в сравнении с $CSN3^{AA}$ и $CSN3^{BB}$.

Рассчитанный критерий достоверности разности между средними величинами двух групп составил 2,25, что указывает на достоверное влияние генотипа каппа-казеина на заболеваемость животных маститом.

Таким образом, выявленная закономерность позитивного влияния гетерозиготного генотипа $CSN3^{AB}$ и аллеля $CSN3^{B}$ гена каппа-казеина на устойчивость к заболеваемости коров белорусской черно-пестрой породы маститами свидетельствует о целесообразности использования $CSN3^{AB}$ в качестве маркера при создании резистентных к данному заболеванию стад в СПК «Ольговское». Однако полученные нами данные требуют изучения для подтверждения аналогичных ассоциаций и в других популяциях коров.

**Заключение.** Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют о целесообразности использования разработанных нами маркеров для идентификации основных возбудителей мастита: Staph. aureus и Strep. agalactiae.

Для создания резистентной к маститу популяции коров в СПК «Ольговское» рекомендуем увеличить концентрацию в стаде особей с генотипами $CSN3^{AB}$ и $CSN3^{BB}$, что станет залогом не только повышения белковомолочности животных, но и их резистентности к данному заболеванию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Головко, А.И. Этиопатогенез и терапия мастита у коров. А.И. Головко, В.Ф. Макеев, И.В. Воропаева, Н.Ю. Мучкина // Ветеринария.- 2001.-№ 12.- С. 35-38.

2. Лысенко, С.Е. Некоторые показатели качества молока при субклиническом мастите. / С.В. Лысенко // Вісн. Полтав. держ. аграр. акад. – 2002.- № 2/3.- С. 100-101

3. Полянцев Ю.Н. Гистологическая картина вымени при гнойно-катаральном мастите. // Новое в борьбе с незаразными болезнями, бесплодием и маститами крупного рогатого скота. – Персиановка, 1986. – С. 79 – 82.

4. Малашко, Д.В. Лазерные технологии при маститах коров / Д.В. Малашко // сборник научных трудов: Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. Горки: УО БГСА.- Вып. 8.- Ч. 2.- 2005.- С. 51-53.

5. Никоноров, П.Н. Распространение маститов у коров и эффективность новых способов их терапии. / П.Н. Никоноров, Ю.Г. Юшков, Е.Ю. Смертина // Эпизоотология, диагностика, профилактика и меры борьбы с болезнями животных.-Новосибирск.- 1997.- С. 287-292.

6. Bennett, R.H. Milk quality and mastitis: the management connection. / R.H. Bennett // Proceedings. 1987. 133-150 Annu. Mett., National mastitis council. Orlando, Fia. 20-23.02. 1987.

7. Morcos, M.B. Bovine mastitis concomitant with post-partum metritis. / M.B. Morcos, A.H. Elyas, E.E.A. Safwat, A.A. Amer // Assiut veter. Med. J. 1988. 18, 38: 47-55.

8. Flinois, J. Considerations sur la flore des mammites bovines banales subaigues. / J. Flinois, C. David // Bull. Soc. Veter. Prat. Fr. 1984. 68, 8: 521-528.

9. Weller, R.F. Somatic cell counts and incidence of clinical mastitis in organic milk proction / R.F. Weller, D.W.R. Davies // Veter. Rec.- 1998.- Vol. 143, № 13.- P. 365-366.- Англ.- Bibliogr.: p. 366.

УДК 636.4:575.174.015.3

# ПОЛИГЕННЫЙ ХАРАКТЕР ДЕТЕРМИНАЦИИ ОТКОРМОЧНЫХ КАЧЕСТВ СВИНЕЙ БЕЛОРУССКОЙ МЯСНОЙ ПОРОДЫ

**Т.И. Епишко[1], Л.А. Танана[2], О.А. Епишко[1], В.В. Пешко[2]**

[1] – УО «Полесский государственный университет», г. Пинск;

[2] – УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Республика Беларусь

*(Поступила в редакцию 27.05.2010 г.)*

***Аннотация.*** *В результате проведенных исследований проанализирована генетическая структура по генам RYR1 и H-FABP различных популяций свиней белорусской мясной породы, разводимых в пяти хозяйствах Республики Беларусь. Выявлена закономерность увеличения показателей возраста достижения живой массы 100 кг (188,9 дня), среднесуточного прироста (718 г) и затрат корма на 1 кг прироста (3,68 к.ед.) у животных с генотипом $RYR1^{NN}H$- $FABP^{HH}H$- $FABP^{dd}$, которые превосходили сверстников с генотипом $RYR1^{NN}H$- $FABP^{HH}H$- $FABP^{Dd}$ на 3,6 дня, 44 г и 0,23 к.ед. соответственно. Установленная закономерность увеличения показателей откормочной продуктивности до 5% свидетельствует о возможности использования данных генотипов в качестве маркеров при селекции свиней на повышение скорости и энергии роста.*